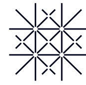

Universität Zürich[UZH]

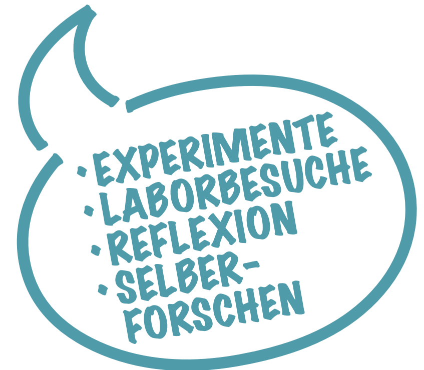
ETH zürich


Universität Basel

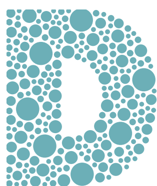
Zurich-Basel Plant Science Center

FORSCHUNGS-HEFT #2

3D-Mikroskopie







1 Klimawandel
2 3D-Mikroskopie
3 Molekulare Pflanzenzucht
4 Stärkemetabolismus
5 Biokommunikation
6 Adaptive Evolution
7 Symbiose
8 Genome Editing

VISIT…

LANZAROTE Caliente.com

In diesem Workshop wirst du eine kurze Einführung in die 3D-Mikroskopie bekommen. Von Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) wirst du Präparate herstellen und unter dem Konfokalmikroskop betrachten. In diesen Keimlingen sind verschiedene Zellbestandteile mit fluoreszierenden Proteinen markiert. Dadurch werden die Zellkompartimente besser sichtbar gemacht. Mit Hilfe einer Software für die Bildanalyse wirst du Konfokalbilder in eine dreidimensionale (3D) Darstellung umwandeln. PD Dr. Célia Baroux von der Universität Zürich verwendet diese Software in ihrer Forschung. Zusammen mit ihr, wirst du entdecken, wo in der Pflanzenforschung die 3D-Mikroskopie wichtig ist.

Alle Wissenschaftler haben ein Notizbuch — Das ist dein FORSCHUNGSHEFT für den Workshop: 3D-Mikroskopie. Du kannst es benutzen, um Notizen zu machen, zu zeichnen oder einfach nur, um hineinzukritzeln. Wir empfehlen, dass du deine Beobachtungen und Fragen notierst. Es ist dein Arbeitsbuch. Wir laden dich ein, mitzudenken und kreativ zu sein. !

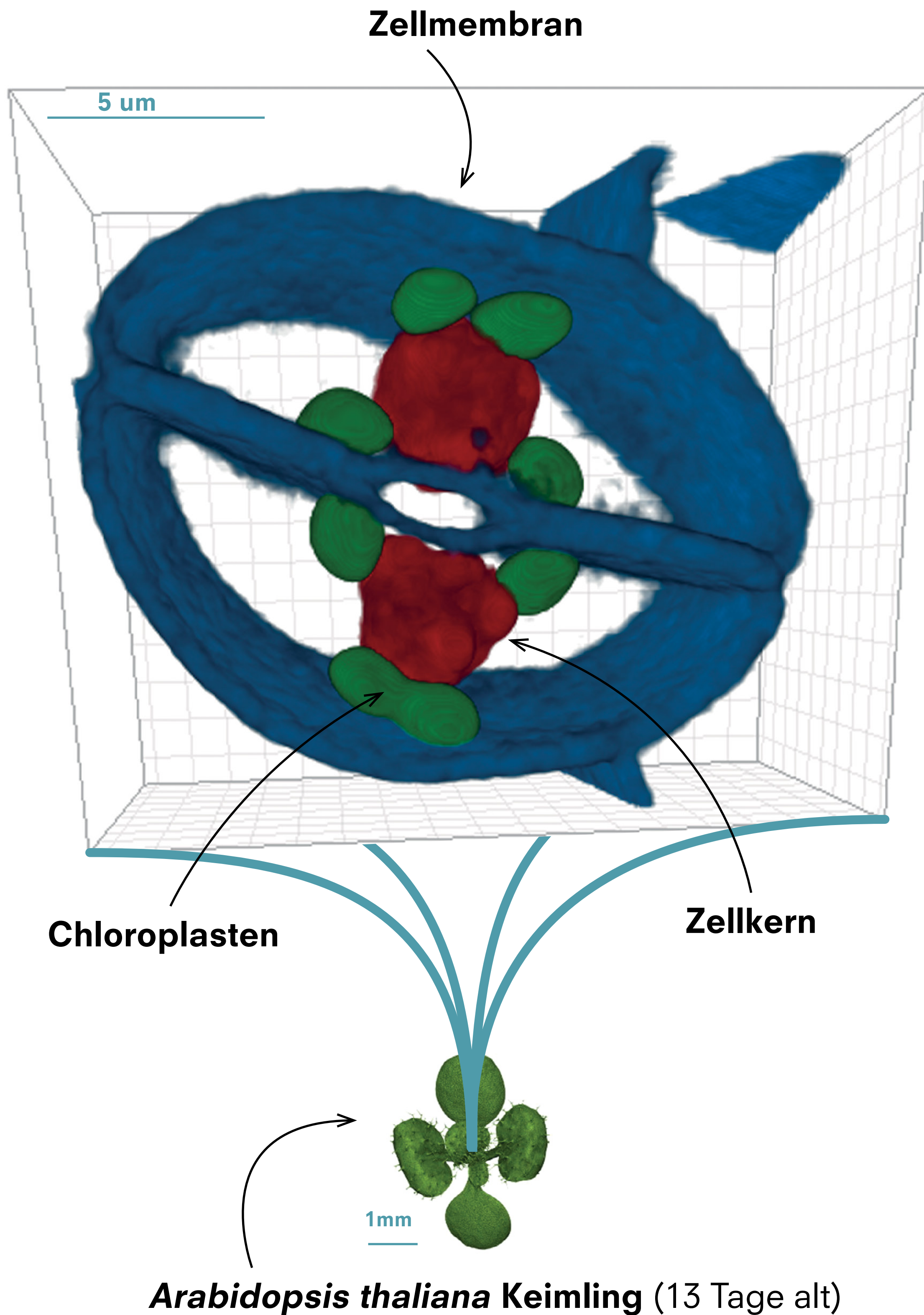
Weitere Lernmaterialien stehen für Lehrpersonen zum downloaden zur Verfügung:

www.plantsciences.uzh.ch/de/outreach/discovery.html

VORWISSEN

- Prinzip der Mikroskopie
- Was ist Fluoreszenz?
- Klassische *vs.* Konfokalmikroskopie
- Bestandteile und Funktionen einer Pflanzenzelle
- Kenntnisse über Agrobakterium und horizontalen Gentransfer

3D-AUFNAHME EINER SCHLIESSZELLE (STOMA)



***Arabidopsis thaliana* Keimling** (13 Tage alt)

FLUORESZENZMIKROSKOP & KONFOKALMIKROSKOP

Fluoreszenzmikroskop
Das Fluoreszenzmikroskop ist ein spezielles Lichtmikroskop. Es beruht auf dem physikalischen Effekt der Fluoreszenz, bei dem gewisse Farbstoffe (= Fluoreszenzfarbstoffe) mit Licht einer bestimmten Farbe angeregt werden, jedoch das Licht in einer anderen Farbe zurückstrahlen. In Abb. 1 wird das Präparat mit violettem Licht angeregt und grünes Licht abgestrahlt. Durch spezielle Filter wird dabei sichergestellt, dass einerseits das Präparat mit der richtigen Farbe angeregt wird (= Anregungsfilter), andererseits, dass nur die eine Farbe des abgestrahlten Lichtes ins Auge des Betrachters (oder in einen Detektor) fällt (= Sperrfilter). Zusätzlich ist noch ein Strahlenteiler eingebaut, der Lichtstrahlen umlenken oder durchlassen kann.

Konfokalmikroskop
Das Konfokalmikroskop (*konfokal* = den gleichen Fokus habend) ist ein spezielles Lichtmikroskop, das nur ein Bild desjenigen Teils des Präparates macht, das gerade in der Schärfeebene liegt und beleuchtet wird. Das Bild wird in einem Computer gespeichert. Die Schärfeebene wird leicht verändert und ein weiteres Bild wird gespeichert. So wird das ganz Präparat abgerastert und tausende von Schnittbildern gespeichert. Obwohl im Mikroskop nie ein vollständiges Bild des Präparates zu sehen ist, können alle gespeicherten Bilder im Computer zusammengefügt werden, was zu einem dreidimensionalen (3D) Bild des Präparates führt.

Abb. 1
Funktionsschema eines Fluoreszenzmikroskops

Quelle: https://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenzmikroskopie#/media/File:Fluoreszenzmikroskopie_2008-09-28.svg

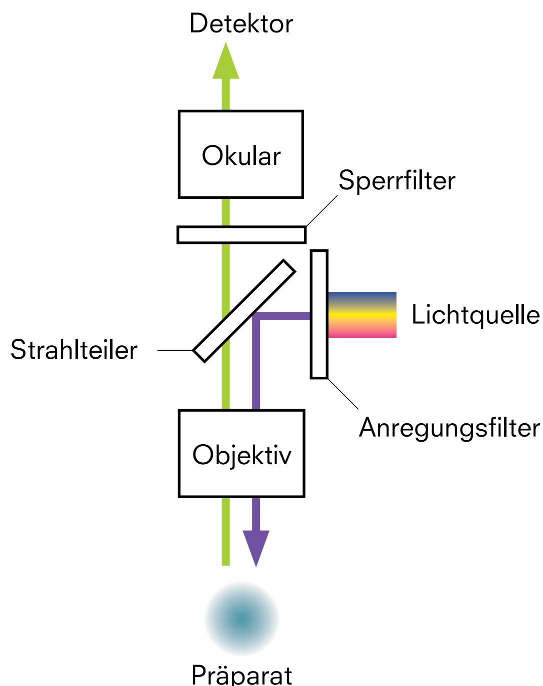
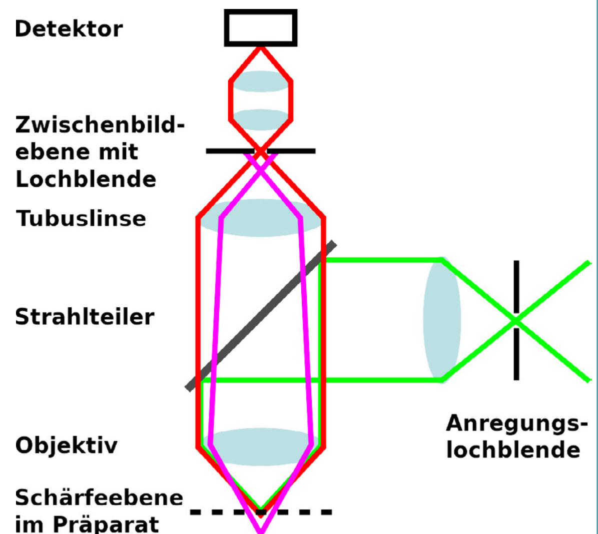


Abb. 2
Funktionsschema eines Konfokalmikroskops

Quelle: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ConfocalPrinciple.svg



Protokoll
Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Du wirst mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) Pflanzenzellen und verschiedene Zellstrukturen sichtbar machen.

PFLANZEN

Im Workshop stellen wir verschiedene Keimlinge (8 Tage alt) von *Arapidopsis thaliana* zur Verfügung. In diesen Keimlingen sind verschiedene Zellbestandteile (die Membran, der Zellkern und die Chloroplasten) mit fluoreszierenden Proteinen markiert.

MATERIALIEN

- ○ Objektträger
- ○ Deckglas
- ○ Glyzerol
- ○ Nadeln
- ○ Spritzflasche mit Wasser

PROBE VORBEREITEN

1. Lege einen Keimling mit Hilfe einer Pinzette auf einen Objekträger. Schneide ein Stück Blatt oder ein Stück Wurzel ab.
2. Lege das Wurzel- oder Blattstück in einen Tropfen Wasser auf einen neuen Objekträger.
3. Lege ein Deckglas darauf.
4. Gib einen Tropfen Glycerol auf das Deckglas.
5. Lege das Präparat sorgfälltig auf den Objektträger beim Mikroskop.
6. Das Bild wird von der Instruktorin gemacht. Achtung mit dem Laserlicht!

3D-REKONSTRUKTION

Dieser Teil erfolgt unter Anleitung am Computer und beinhaltet folgende Schritte: 3D-Rekonstruktionen von Bildsequenzen, Volume Rendering, Bildsegmentierung zur Visualisierung und Quantifizierung von fluoreszierenden Signalen. Aus Zeitgründen können nicht alle Schritte im Workshop gemacht werden. Du bekommst schon rekonstruierte Bilder, die du mit Hilfe einer Software betrachten kannst.

Was für Zelltypen kannst du erkennen?

Zeichne ...

Haben alle Pflanzenzellen Chloroplasten?
Zähle die Chloroplasten in einer Zelle.
Gibt es Unterschiede in der Anzahl zwischen den Geweben?

Notiere ...

Die Zellkerne enthalten das Erbgut. Wenn die Zellen sich nicht teilen, sind die Chromosomen ausgepackt und entfaltet. Diese sind hier mit einem Chromatin-Marker gefärbt. Beobachte die Zellkerne in den verschiedenen Zellen. Notiere Unterschiede in Form und Grösse. Ist die Färbung gleichmässig? Was könnte dies bedeuten?

Untersuche die Blatthaare (Trichome).
Beschreibe ihre Formen.
Welche Funktion erfüllen sie für die Pflanze?

Reflektiere, wie Entwicklungen von Abbildungstechniken zu neuen Entdeckungen in den Pflanzenwissenschaften führen können.

Notiere drei Hypothesen:

1.

2.

3.

Mögliche weitere Fragen:

In diesem Workshop hattest du die Möglichkeit, die 3D-Software kennenzulernen und deine eigenen Fotos oder Filme damit zu machen.
Diese kannst du nun verwenden, um eine eigene Frage zu Pflanzenzellen zu beantworten.
Vielleicht ist dir eine Frage eingefallen, die während des Workshops nicht besprochen wurde.
Sei neugierig! Überlege dir, was du über die Struktur und Funktion von Pflanzenzellen mit Hilfe der Fotos und Filme herausfinden kannst.

RELEVANZ IN WISSENSCHAFT & GESELLSCHAFT



Die Auflösung von Bildaufnahmen in der Konfokalmikroskopie ist in den letzten Jahren immer besser geworden. Heute können Gene und kleinste Zellmoleküle sichtbar gemacht werden. Neue Software-Technologien ermöglichen dreidimensionale (3D) Rekonstruktionen von Bildaufnahmen. Dies ermöglicht Forschenden in bisher verborgene Welten einzutauchen. Durch räumliche Darstellungen können beispielsweise komplexe DNA-Protein-Strukturen in der Zelle untersucht werden.

Ein Beispiel: Genetisch identische Pflanzen haben völlig verschiedene Wuchsformen, wenn sie an unterschiedlichen Standorten wachsen. Das macht Sinn, da Pflanzen sich nicht bewegen können und daher spezielle Mechanismen entwickeln müssen, um sich an ihren Standort anzupassen. Molekularbiologische Analysen ergaben, dass je nach Standort unterschiedliche Gene aktiviert (transkribiert) werden. Die Umgebung hat also einen Einfluss auf die Aktivität der Pflanzengene. Der Phänotyp, also das Aussehen einer Pflanze, wird durch unterschiedliche Aktivierungsmuster von Genen in unterschiedlichen Umwelten bestimmt.

Aber wie werden die Gene aktiviert? Forschende wie Célia Baroux an der Universität Zürich untersuchen, wie die Gene im Zellkern verpackt werden. Proteine (sogenannte Histone) spielen bei der Verpackung der DNA eine wichtige Rolle. Um die Histone in der Zelle sichtbar zu machen, markiert Célia Baroux diese mit fluoreszierenden Farbstoffen. Mit Hilfe von konfokalen Bildaufnahmen und 3D-Rekonstruktionen kann sie die Bewegung von diesen Proteinen in den Pflanzenzellen verfolgen und Rückschlüsse auf ihre Funktion ziehen. So hat sie beispielsweise entdeckt, dass Licht oder andere Signale aus der Umwelt, die Position von Genen im Zellkern verändern. Die Position und die Art wie Gene in der DNA verpackt sind, beeinflusst deren Transkriptionsrate. Ist die DNA weniger dicht verpackt, sind die Gene für den RNA-Polymerase-Proteinkomplex leichter zugänglich.

In Zukunft werden Forschende in der Lage sein, 4D-Rekonstruktionen zu machen. Im Vergleich zu 3D-Rekonstruktionen kommt noch eine zeitliche Komponente dazu. Diese erlaubt die Entwicklungsprozesse oder die physiologischen Änderungen bei den Pflanzen «live» zu beobachten.

Die rasante Entwicklung der Bildrekonstruktionen ist nicht nur für die Pflanzenwissenschaften von Bedeutung, sondern auch für die Medizin. Das Verständnis über den Aufbau von Zellen und Geweben, hilft den Forschenden geschädigtes Gewebe in Funktion und Struktur wiederherzustellen. Vielleicht können wir eines Tages aus einer einzigen Zelle ein Gewebe oder ein Organ für Haut- oder Organtransplantationen generieren.

Referenz: Rutowicz, K., Lirski, M., Mermaz, B. *et al.* (2019). Linker histones are fine-scale chromatin architects modulating developmental decisions in Arabidopsis. In: Genome Biol, Vol. 20, 157. https://doi.org/10.1186/s13059-019-1767-3

A-Z GLOSSARY

Chromosom
Chromosomen sind Makromolekül-Komplexe, die Gene und somit auch Erbinformationen enthalten. Sie bestehen aus DNA, die mit vielen Proteinen verpackt ist. Diese Mischung aus DNA und Proteinen wird auch als Chromatin bezeichnet. Etwa die Hälfte der Proteine sind Histone.

Histone
Histone sind Proteine, die im Chromatin für die Verpackung der DNA zuständig sind.

Phänotyp
Der Phänotyp beschreibt das Aussehen, die Physiologie oder das Verhalten eines Individuums. Der Phänotyp wird durch das Zusammenwirken von Erbanlagen und Umweltfaktoren bestimmt. Die Fähigkeit auf Umwelteinflüsse zu reagieren, ist genetisch festgelegt.

Plastizität
Plastizität ist die Eigenschaft einzelner Zellen, sich in Abhängigkeit von der Umwelt zu verändern.

Transkription
Bei der Transkription wird DNA durch den RNA-Polymerase-Proteinkomplex zu messenger RNA (mRNA) umgeschrieben und aus dem Zellkern in das Cytoplasma und zu den Ribosomen (Ort der Proteinbiosynthese) transportiert.

Translation
Übersetzung der mRNA in Aminosäureketten (Proteine).

Zytogenetik
Die Zytogenetik ist ein Teilgebiet der Genetik. Untersucht werden Anzahl, Gestalt, Struktur und Funktion der Chromosomen. Die Untersuchungen der Chromosomen erfolgen meistens mit einem Mikroskop.

CÉLIA BAROUX
Molekulare Zellbiologin





Forschungsprojekte

Célia und ihre Forschungsgruppe untersuchen die Funktion und den Aufbau vom Zellkern. Vor allem interessiert sie, welche Bestandteile des Zellkerns bei der Entwicklung von Pflanzen eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehört zum Beispiel das Chromatin, ein DNA-Protein-Komplex, welcher bei der Zellteilung verschiedene Formen annimmt. Célia verwendet verschiedene molekulare und zytogenetische Techniken für ihre Studien. Die quantitativen und hochauflösenden 3D-Analysen innerhalb ganzer Pflanzengewebe ermöglichen ihr völlig neue Einblicke in die Organisation des Zellkerns und dessen Funktion.

In einem vom Schweizerischen Nationalfonds geförderten Forschungsprojekt untersucht Célia die Funktion von Histonen. Histone sind Proteine, die als Bestandteile des Chromatins für die Verpackung der DNA während der Zellteilung zuständig sind. Die Mechanismen, die diesen Strukturveränderungen zu Grunde liegen, sind bislang nur wenig verstanden. Forschende wie Célia vermuten, dass in der Art und Weise wie die DNA verpackt wird, die Information für zukünftige Zelldifferenzierungen kodiert wird. Je nachdem, welche Histone wo und in welcher Menge in Aktion treten, verändert sich die Kompaktierung und somit das Schicksal der Zelle. Für Pflanzenzellen ist diese Flexibilität eine der Grundlagen für Fähigkeit, sich an verändernde Umweltbedingungen anzupassen.

Link zu ihren spektakulären Videoaufnahmen:
www.botinst.uzh.ch/research/development/celiabaroux.html

http://p3.snf.ch/project-149974
http://p3.snf.ch/project-182949
http://p3.snf.ch/project-185186

Q+A

Wie bist du zu deinem Forschungsgebiet gekommen?
Ich habe Zellbiologie und Immunologie studiert und war vom Mikroskopieren begeistert. Ich habe schnell gemerkt, dass mich der Zellkern am meisten interessiert. Es fasziniert mich zu sehen, dass er wie ein Orchesterdirigent über die Gestalt und Entwicklung der Zelle waltet. Ebenso faszinierend für mich ist die pflanzliche Zellplastizität. Aus einer einzigen Zelle können die unterschliedlichsten Organe entstehen.

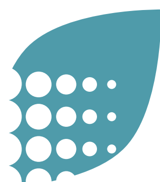
Was sind die wichtigsten Voraussetzungen für deinen Beruf?
Du musst es mögen, Fragen zu stellen und Probleme zu lösen. Kreativität und Neugierde sind die Quelle für die Forschung. Zu einer Karriere in der Wissenschaft gehört aber auch, dass man aus Fehlern lernt. Die meisten Erkenntnisse werden aus Experimenten gewonnen, die nicht so verlaufen, wie man sie geplant hat. Du musst für verschiedene Lösungen offen bleiben. Vielleicht liegt gerade im Verborgenen die grosse Entdeckung. Wichtig ist heute auch die internationale Zusammenarbeit. Viele Wissenschaftler*innen forschen im Laufe ihrer Karriere in verschiedenen Ländern. Dabei ist eine gute Kommunikation wichtig. Als Wissenschaftlerin solltest du in der Lage sein, deine Arbeit ganz unterschiedlichen Menschen zu präsentieren. Damit meine ich nicht nur die Bevölkerung, sondern auch innerhalb des Forschungsteams.

Was sind die nächsten Herausforderungen?
Das ist die Suche nach der Ursache. Was war zuerst da, das Huhn oder das Ei? Diese Frage wird uns noch lange beschäftigen. Ich persönlich möchte verstehen, wie strukturelle Veränderungen im Zellkern die Entwicklung der Zellen bestimmen. Also auch hier, was kommt zuerst: bestimmt die Struktur die Zellentwicklung oder bestimmt die Zellentwicklung die Struktur?

ZURICH-BASEL PLANT SCIENCE CENTER

Das Zurich-Basel Plant Science Center ist ein Kompetenzzentrum für Pflanzenwissenschaften an den drei Hochschulen ETH Zürich, Universität Zürich und Universität Basel. Es umfasst 45 Forschungsgruppen mit rund 600 Forschenden. Das Zentrum fördert sowohl Grundlagenforschung, wie auch angewandte Forschung in den vielseitigen Disziplinen der Pflanzenwissenschaften. Das Zurich-Basel Plant Science Center bietet ein breites Angebot an Workshops, Exkursionen und Freizeitaktivitäten für Lehrpersonen, Familien, Schulklassen und interessierte Personen an, mit der Möglichkeit, Pflanzenforschung zu erleben und mit Wissenschaftler*innen vor Ort zu diskutieren.

Aktuelle Angebote finden Sie hier: plantsciences.uzh.ch/de/outreach





Unterstützung
Die Plant Science Discovery Workshops wurden unterstützt vom Schweizerischen Nationalfonds.
Agora Grant Nr. 158542: PSC Discovery Programm für Jugendliche.

Partner
ETH MINT Lernzentrum

Copyright
© Zurich-Basel Plant Science Center
Plant Science Discovery Workshop: 3D-Mikrokopie, 2020

Die Inhalte sind unter CC BY-NC-SA 4.0 verfügbar.

Zitiervorschlag
Baroux, C., Schläpfer, J., Rapo, C., Faller, P., Paschke, M., Dahinden, M. (2020). Plant Science Discovery Workshops: Forschungsheft#2 3D-Mikroskopie. Zurich-Basel Plant Science Center. https://doi.org/10.3929/ethz-b-000420287

ISBN: 978-3-906327-17-4

Herausgeber
Zurich-Basel Plant Science Center
Geschäftstelle, ETH Zürich, TAN D5.2
Tannenstrasse 1
8092 Zürich
Schweiz
+41 44 632 23 33
info-plantscience@ethz.ch
www.plantsciences.ch

AutorInnen
Célia Baroux, Juanita Schläpfer, Carole Rapo, Patrick Faller, Melanie Paschke, Manuela Dahinden

Layout & Illustration
fabianleuenberger.com

Weitere Lernmaterialien
www.plantsciences.uzh.ch/de/outreach/atschool/discovery

Version 2.5. — 2020-12-10